

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Holoubková

ANALÝZA ADENOSINOVÝCH RIBONUKLEOTIDŮ
IONTOVĚ VÝMĚNNOU CHROMATOGRAPHIÍ

Analysis of adenosine ribonucleotides by ion-exchange
chromatography

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. května 2019

Barbora Holoubková

Abstrakt

Tato bakalářská práce byla zaměřena na optimalizaci stanovení adenosinových ribonukleotidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím iontové výměnné chromatografie a na výběr vhodné metody jejich extrakce z rostlinného materiálu. Pro stanovení byla použita isokratická eluce mobilní fází, tvořenou z 60 objemových % roztokem $0,2\text{mol/dm}^3$ dihydrogenfosforečnanu draselného a ze 40 objemových % acetonitrilem. Roztok pufru byl upraven 1mol/dm^3 hydroxidem draselným na hodnotu $\text{pH} = 5,0$. Separace probíhala na koloně od společnosti Marcherey-Nagel s označením Nucleogel SAX 1000-8 o rozměrech $50 \times 4,6$ mm. Teplota kolony byla nastavena na 30°C a průtoková rychlost mobilní fáze byla 1 ml/min . Detekce probíhala s využitím DAD detektoru. Z absorpčních spekter pak byla vybrána vlnová délka 260 nm , která odpovídala absorpčnímu maximu analyzovaných ribonukleotidů. Ribonukleotidy eluovaly v pořadí adenosinmonofosfát, adenosindifosfát a adenosintrifosfát.

Extrakce studovaných adenosinribonukleotidů byla provedena z rostlinné matrice, kterou tvořily lyofilizované listy *Nicotiana tabacum L.* Extrakce byla prováděna v chladu pomocí chlazených rozpouštědel a ledu. Jako rozpouštědlo byl využit roztok čistého methanolu a deionizované vody v poměru jedna ku jedné, acetonitril a fosforečnanový pufr ve stejném poměru jako v mobilní fázi a roztok $1,5\text{mol/dm}^3$ kyseliny chloristé.

Klíčová slova: adenosinové ribonukleotidy, ATP, ADP, AMP, HPLC, iontově výměnná chromatografie, extrakce, rostlinná matrice

Abstract

This bachelor thesis was focused on optimization of adenosine ribonucleotides' determination using ion-exchange high-performance liquid chromatography and on selection of their suitable extraction method from plant material. Isocratic elution with a mobile phase consisting of 60% of 0.2mol/dm³ potassium dihydrogenphosphate and 40% of acetonitrile (v/v) was used for the determination. The pH of the buffer solution was adjusted with 1mol/dm³ potassium hydroxide to the value 5.0. The separation was carried out using a column from Marcherey-Nagel with the designation Nucleogel SAX 1000-8 having the dimensions of 50 x 4.6 mm. The column temperature was set to 30 °C and the mobile phase flow rate was 1 mL/min. Analytes' detection was performed using a DAD detector. From the absorption spectra, a wavelength of 260 nm was then selected, corresponding to the absorption maximum of the analyzed ribonucleotides. Ribonucleotides eluted in the following order: adenosine monophosphate, adenosine diphosphate, and adenosine triphosphate.

Extraction of the studied adenosine ribonucleotides was performed from a plant matrix consisting of lyophilized leaves of *Nicotiana tabacum L.* The extraction procedure was carried out at low temperature using cooled solvents and ice. The extraction solvents consisted of methanol: deionized water mixture in 1:1 ratio (v/v), or acetonitrile: phosphate buffer in 4:6 (v/v) ratio or 1.5mol/dm³ solution of perchloric acid.

Keywords: adenosine ribonucleotides, ATP, ADP, AMP, HPLC, ion exchange chromatography, extraction, plant matrix

Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména vedoucí bakalářské práce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za trpělivý odborný dozor, díky němuž jsem zvládla svou práci po teoretické i praktické stránce. Dále bych za morální i materiální podporu ráda poděkovala své rodině a jmenovitě Ing. Janu Fišerovi, za konečné úpravy, kontrolu a editaci. Nakonec bych ráda poděkovala autorům publikací a literatury, ze kterých jsem čerpala, a vyučujícím, kteří mě provázeli studiem chemie za poslední tři roky.

Obsah

1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Studované látky.....	10
2.1.1 Základní struktura a vlastnosti nukleotidů.....	10
2.1.2 Adenosinové ribonukleotidy	12
2.2 Rostlinná matrice	14
2.2.1 Tabák	14
2.2.2 Rostlinný stres	15
2.3 Metody analýzy studovaných látek.....	16
2.3.1 Extrakce.....	16
2.3.1.1 Extrakce nukleotidů z rostlinné matrice.....	17
2.3.2 Metody stanovení adenosinových nukleotidů	18
2.3.2.1 Bioluminiscenční metody.....	19
2.3.2.2 Chromatografické metody.....	19
2.3.2.3 Fluorescenční metody	20
2.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	20
2.3.3.1 Typy HPLC	21
2.3.3.2 Instrumentace HPLC	22
2.3.3.3 Iontově výměnná chromatografie.....	23
2.3.3.4 Problémy a doporučení v laboratorní praxi.....	24
3 Experimentální část	26
3.1 Chemikálie	26
3.2 Instrumentace	26
3.3 Rostlinný materiál.....	27
3.4 Pracovní postup.....	27
3.4.1 Příprava mobilní fáze.....	27
3.4.2 Příprava standardů	27
3.4.3 Extrakce	28
4 Výsledky a diskuse	30
4.1 Optimalizace experimentálních podmínek	30
4.1.1 Opakovatelnost měření vzorků standardů	32
4.2 Kalibrační závislost standardů	35
4.3 Extrakce AMP, ADP a ATP z rostlinného materiálu	40
5 Závěr	45
6 Soupis bibliografických citací	46

Seznam zkratek a symbolů

°C – stupeň Celsia, jednotka teploty
μl – mikrolitr, jednotka objemu
μm – mikrometr, jednotka délky
ADP - adenosindifosfát
AMP - adenosinmonofosfát
ATP – adenosintrifosfát
ATPasa – skupina enzymů hydrolyticky štěpící ATP
c – molární koncentrace, mol/dm³
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
cm – centimetr, jednotka délky
DAD – detektor diodového pole
DNA – deoxyribonukleová kyselina
FAD - flavinadenindinukleotid
g – gram, jednotka hmotnosti
GC – plynová chromatografie
GFC – gelová filtrační chromatografie
GMP - guanosinmonofosfát
HILIC – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC – iontově výměnná chromatografie
IMP - inosinmonofosfát
IPC – chromatografie iontových párů
LC – kapalinová chromatografie
LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD – mez detekce
LOQ – mez stanovitelnosti
mg – miligram, jednotka hmotnosti
mm – milimetr, jednotka délky
NAD(P) – nikotinamidadenindinukleotid (fosfát)
nm – nanometr, jednotka délky
pH – záporný dekadický logaritmus koncentrace kationtů vodíku

psi – jednotka tlaku, síla jedné libry na čtvereční palec

RNA – ribonukleová kyselina

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

rpm – otáčky za minutu

SPE – extrakce tuhou fází

t_r - retenční čas, [min]

UV – ultrafialové záření

1 Úvod

Nukleotidy jsou důležitými biomolekulami, které se podílejí na procesech nezbytných pro přežití buňky. Zastávají významnou roli v přenosech genetické informace, biosyntéze, buněčné signalizaci a v přenosu energie v buňce. Každý nukleotid se skládá ze sacharidu ribosy nebo deoxyribosy, na kterém je navázána dusíkatá báze a jedna nebo více fosfátových skupin. Dusíkaté báze se dělí na purinové a pyrimidinové a podle počtu fosfátových skupin jsou nukleotidy nazývány monofosfáty, difosfáty nebo trifosfáty [1, 2].

Adenosintrifosfát (ATP) je nenahraditelným nositelem energie v buňce. Obsahuje tři fosfátové skupiny, z nichž dvě krajní jsou spojeny fosfoanhydridovými vazbami, které při hydrolytickém štěpení uvolňují velké množství energie. Štěpením těchto vazeb přechází adenosintrifosfát reversibilně na adenosindifosfát nebo až na adenosinmonofosfát. Hladina adenosintrifosfátu v buňce je dobrým indikátorem zdravotního stavu buňky. U rostlin tato hladina vypovídá nejen o jejich zdravotním stavu, ale i o podmínkách jejich pěstování, v důsledku účasti molekul ATP ve fotosyntetickém cyklu. V potravinářském průmyslu je stanovení ATP významnou metodou určení čerstvosti a vhodného způsobu skladování ryb a mořských plodů [3].

Cílem této bakalářské práce byla optimalizace podmínek pro analýzu adenosinových ribonukleotidů s využitím iontově výměnné vysokoúčinné kapalinové chromatografie tak, aby adenosintrifosfát, adenosindifosfát (ADP) a adenosinmonofosfát (AMP) poskytovaly co nejlepší signál a aby jejich vzájemná separace byla možná v co nejkratším čase. Dále bylo cílem nalézt vhodnou extrakční techniku prováděnou v chladu, která by umožnila získat detekovatelné množství nerozloženého ATP z lyofilizovaných listů tabáku virginského.

2 Teoretická část

V teoretické části jsou popsány zkoumané látky a metody, s nimiž budou látky extrahovány a analyzovány.

2.1 Studované látky

Pro jasné definování zkoumaných látek je zde uvedena jejich struktura, vlastnosti a význam pro živočišné i rostlinné buňky.

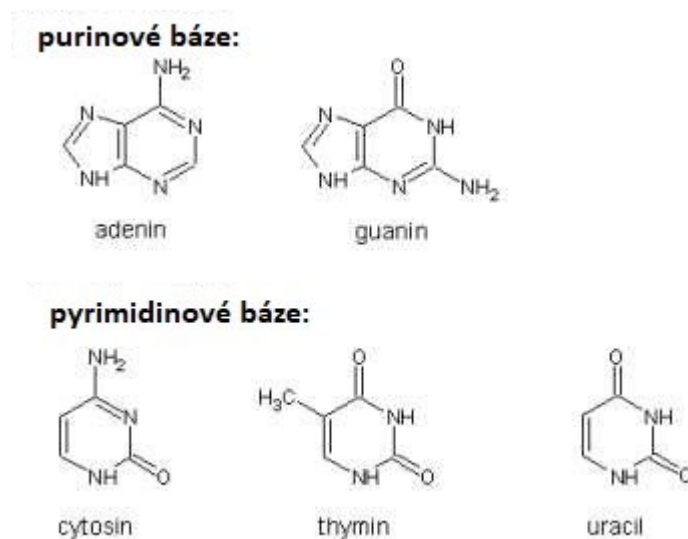
2.1.1 Základní struktura a vlastnosti nukleotidů

Životaschopnost rostlinných i živočišných buněk je podmíněna existencí a metabolismem řady biomolekul. Nukleotidy se podílí na téměř každém aspektu života buňky, například na oxidačně-redukčních reakcích, intracelulární signalizaci, přenosu energie a biosyntetických procesech. Jsou také základními stavebními jednotkami biopolymerů nukleových kyselin, které vznikají jejich řetězením. Nukleovými kyselinami souhrnně nazýváme deoxyribonukleovou kyselinu a ribonukleovou kyselinu, tedy DNA a RNA, a pro buňku mají nepostradatelný význam. Nukleotidy obsažené v DNA se podílejí na uchovávání a přenosu genetické informace a v RNA jsou součástí proteosyntézy, tedy tvorby bílkovin. Žádná jiná skupina molekul se v buňce nepodílí na tolika různých funkcích nezbytných pro život tak, jako nukleotidy a nukleové kyseliny [1, 2, 4].

V obou nukleových kyselinách jsou nukleotidy tvořeny dusíkatou bází, sacharidem a nejméně jedním zbytkem kyseliny fosforečné. V ribonukleotidech je tento sacharid tvořený ribosou, což je pětiuhlíkatý sacharid neboli pentosa, zatímco v deoxyribonukleotidech se jedná o 2'-deoxyribosu, které na uhlíku v pozici 2' chybí hydroxylová skupina [5].

Dusíkaté báze nukleotidů jsou strukturními deriváty purinů nebo pyrimidinů, jedná se tudíž o planární, aromatické a heterocyklické molekuly. Představitelé purinových bází jsou obvykle adenin a guanin, pyrimidinových jsou cytosin, uracil a thymín. Struktury těchto bází jsou uvedeny na obr. 1. Puriny se na pentosu váží N-glykosidovou vazbou přes dusík v poloze devět, zatímco pyrimidiny se váží touto vazbou přes dusík v poloze jedna. DNA se v případě dusíkatých bází liší od RNA zastoupením

pyrimidinového thyminu, který je v RNA nahrazen uracilem. Navázáním dusíkaté báze na sacharid vzniká nukleosid, jehož název je odvozen od příslušné báze, například adenosin, cytosin, guanosin [3, 4].



Obr. 1 Struktura dusíkatých bází odvozených od purinu a pyrimidinu [6].

Poslední složku nukleotidů tvoří jedna nebo více fosfátových skupin. Tyto skupiny jsou navázány na pentosu fosfodiesterovou vazbou na kteroukoliv hydroxylovou skupinu. U RNA se tedy mohou navázat na uhlíky 2', 3' a 5', kdežto u DNA obsahujících deoxyribosu pouze na uhlíky 3' a 5'. Navázány mohou být jedna, dvě nebo tři fosfátové skupiny, od čehož se dále odvíjí i název nukleotidu jako monofosfát, difosfát nebo trifosfát. Díky energii nashromážděné vytvářením jedné nebo více vazeb mezi fosfáty jsou molekuly difosfátů a trifosfátů označovány jako vysokoenergetické, takzvaně makroergní, sloučeniny. Fosfátové skupiny jsou ionizované, a proto se nukleotidy svým chováním řadí mezi středně silné kyseliny [3,5].

Zdroje nukleotidů mohou být dvojího typu. Endogenní nukleotidy jsou syntetizovány samotným organismem z různých molekul, jako jsou amoniak, oxid uhličitý, kyselina listová, ribosa (pyrimidiny), glycin, aspartát a glutamin (puriny). V některých cyklech lze použité nukleotidy znovu obnovit a dále využít, ale ani za těchto okolností by hladina nukleotidů, které organismus potřebuje, nebyla dostačující. Proto je třeba přijímat i nukleotidy exogenní ve formě potravy nebo výživy [7].

Nukleotidy mají kromě ukládání a opětovného vyvolávání genetické informace v podobě monomerů nukleových kyselin ještě i několik dalších důležitých funkcí. Jednou z takových funkcí je krátkodobé přenášení chemické energie ve vysokoenergetických vazbách mezi fosfátovými skupinami, jejichž hydrolýzou se uvolní velké množství energie. Také se váží na další skupiny molekul za vzniku koenzymů, například koenzymu A. Dále se účastní signálních kaskád ve formě druhých posílů (cyklický adenosinmonofosfát a guanosinmonofosfát). Nukleotidy jsou také obsaženy v mnoha kofaktorech enzymů jako například FAD, kobalaminu, NAD(P) a již zmíněném koenzymu A [5, 8].

2.1.2 Adenosinové ribonukleotidy

Nukleotidy obsahující sacharid ve formě ribosy a bázi v podobě adeninu, tedy dle názvosloví adenosiny, se nazývají adenosinové ribonukleotidy, nebo také adenosinfosfáty či adeninribonukleotidy. Jedná se o souhrnné pojmenování molekul AMP, ADP, ATP a cyklického AMP. Jejich struktura je na obr. 2 [5].

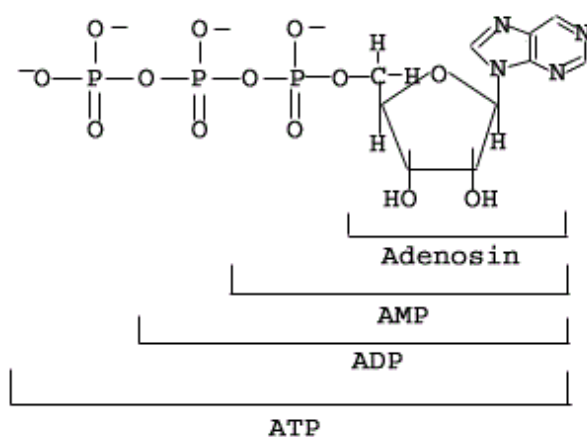
Purinové nukleotidy obecně se syntetizují z molekuly inozinového monofosfátu IMP, z něhož vzniká báze hypoxanthin, která je přeměněna buď na adenin, nebo na guanin. Vzniklé nukleosidové monofosfáty, tedy AMP nebo GMP, jsou poté fosforylovány pomocí *nukleosidfosfátkinas* na difosfáty, a nakonec *nukleosiddifosfátkinasami* až na trifosfáty [3].

Adenosinové nukleotidy mají v organismu několik nenahraditelných funkcí. Nejznámější zástupce této skupiny nukleotidů, adenosin trifosfát, je makroergní sloučenina, jejíž hydrolýza poskytuje chemickou energii mnoha buněčným reakcím. Zejména zastává důležitou roli v biosyntéze z termodynamického hlediska při spřáhování s reakcemi, které by bez přítomnosti ATP nemohly probíhat [9].

Dále se adeninové nukleotidy vyskytují jako součást mnoha kofaktorů enzymů, které působí v široké škále chemických procesů v buňce i celém organismu. Přestože si strukturálně tyto kofaktory, kromě přítomnosti adenosinu, nejsou podobné a přítomnost adenosinu většinou nezasahuje do jejich primárních funkcí, odebrání adenosinu z molekuly vede k drastickému snížení jejich aktivity [9].

Další funkce adenosinových nukleotidů je v podobě regulačních molekul. Buňky reagují na okolní prostředí díky informacím přijímaným pomocí hormonů a dalších signálních molekul. Interakce těchto vnějších chemických signálů, takzvaných prvních poslů, s receptory na povrchu buňky vede k produkci druhých poslů, které se podílí na změnách a reakcích uvnitř samotné buňky. Často je oním druhým poslem nukleotid a to nejčastěji právě adenosinový nukleotid cAMP neboli cyklické AMP, které vzniká z ATP reakcí katalyzovanou *adenylátcyklasou* [9].

Adeninové nukleotidy mají také signální funkci v podobě neurotransmiterů. Konkrétně ATP a ADP slouží jako signální molekuly v mnoha jednobuněčných i mnohobuněčných organizmech, včetně člověka. U savců je ATP některými neurony vypouštěno do synapsí, což vede ke změně membránového potenciálu nebo vypuštění druhých poslů. Následuje příslušná fyziologická odezva, jako například zánět, kontrakce hladkých svalů nebo zaznamenání určité chuti. Extracelulární ADP je signální molekula zaměřující se na citlivé buňky. V lékařství se pomocí léčiv zabráňuje navázání ADP na receptory krevních destiček, čímž se předchází nežádoucímu srážení krve u pacientů s nemocemi srdce [9].



Obr. 2 Struktura adenosinových ribonukleotidů [10].

Molekula ATP, neboli adenosintrifosfátu, se skládá z nukleosidu, tvořeného ribosou a dusíkatou bází adeninem spojených pomocí N-glykosidické vazby, a tří fosfátových skupin, jež se označují jako α , β a γ . Vazba mezi ribosou a fosfátovou skupinou je fosfoesterová, mezi samotnými fosfáty se pak jedná o vazbu fosfoanhydridovou, která je o mnoho labilnější a snáze hydrolyzovatelná [5].

ATP je často nazýváno zásobárnou energie, ale jedná se spíše o nositele energie nebo prostředníka přenosu energie. V buněčných procesech jako je fotosyntéza nebo rozklad látek z potravy, sacharidů a mastných kyselin, vzniká ATP z ADP. Poté difunduje po celé buňce, aby dodalo energii dalším na něm závislým procesům, jako je biosyntéza, transport iontů a pohyb buňky. Chemická energie z ATP se uvolňuje po odštěpení jedné nebo dvou fosfátových skupin, které jsou předávány jiné molekule. Přestože koncentrace ATP v buňce je relativně nízká, v lidském těle dochází denně k recyklaci takového množství ATP, jako je váha daného jedince, což dokazuje, kolik ATP je denně spotřebováno na provoz buněk a organismu [3].

Kromě svého velkého významu v buněčné energetice je ATP velmi významná signální molekula, která reaguje na mnoho stresových situací pro organismus. Jeho množství se změní například při hypoxii, hyperkapnii a změnách pH. Dále je ovlivnitelné mechanickými druhy stresu a nemocemi jako například cystická fibróza, plicní hypertenze a diabetes. ATP se tedy účastní takového počtu buněčných procesů, že lze díky jeho stanovení zhodnotit stav a zdraví buňky, což má velký význam pro mnoho odvětví zabývajících se fyziologií rostlin, živočichů nebo člověka [11].

2.2 Rostlinná matrice

2.2.1 Tabák

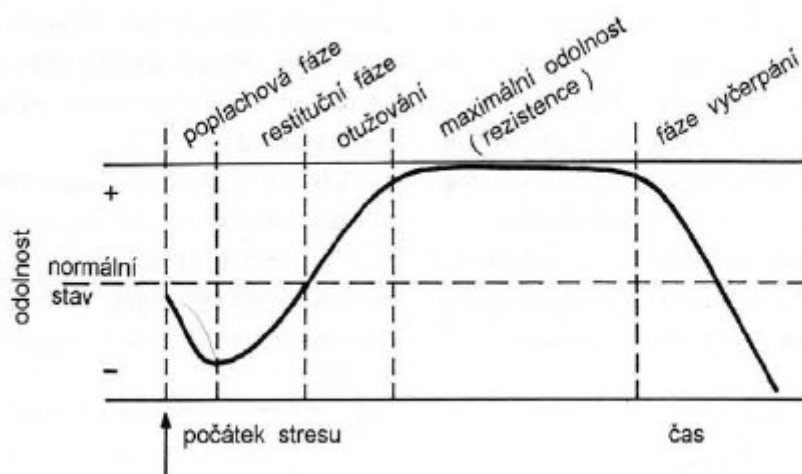
Rod tabáku, latinsky *Nicotiana*, patří do čeledi lilkovitých v třídě vyšších dvouděložných rostlin. Původně pochází z amerického kontinentu a do Evropy ho poprvé přivezl za vlády Alžběty I. sir Walter Raleigh. V dnešní době má velký hospodářský význam. Jeho listy se převážně používají v tabákovém průmyslu, ale vyrábí se z nich i samotný nikotin, kyselina jablečná, chlorofyl nebo kyselina citrónová. Také jeho květy mají široké využití, a to převážně v kosmetickém průmyslu. Semena se lisují a vyprodukovaný olej se používá k výrobě laků, odpad z výroby oleje pak slouží jako krmivo pro zemědělská zvířata [12].

V této práci byl konkrétně používán tabák virginský. Latinské pojmenování tohoto rodu tabáku je *Nicotiana tabacum* L. Pochází patrně z oblasti současného Peru. Dnes volně roste jak v oblasti And, tak v oblasti amazonské. Vzácně ho lze vidět i v České republice. Jedná se o jednoletou bylinu, která může dorůst až do 300 cm, má přisedlé,

kopinaté listy a složené květenství, jeho plodem je tobolka. Využívá se nejen v tabákovém průmyslu, ale i k produkci insekticidů a z jeho stonků se vyrábí buničina. Jeho listy obsahují několik alkaloidů, tedy přírodních jedů. Nejznámější z nich je patrně nikotin, derivát pyridinu, který stimuluje centrální nervovou soustavu, zvyšuje tlak a má antidiuretické účinky, jedná se o velmi návykovou látku [13].

2.2.2 Rostlinný stres

Slovem stres je obecně nazýván stav, kdy se rostlina nachází v ohrožení jejích životních funkcí, orgánů nebo jí hrozí uhynutí. Faktory, které rostlinu do takového stavu uvádějí, se nazývají souhrnně stresory. V důsledku nemožnosti rostlin před hrozbou utéct a větší heterogenitě vnitřního prostředí, je u nich fyziologie stresu komplexnější než u živočichů. Výzkum této oblasti znesnadňuje i obrovská druhová různorodost. Každý druh rostlin má vyvinuty jiné obranné mechanismy a určit moment, kdy stresová reakce začala, je velmi obtížné. Rostliny se stresu vyhýbají různými způsoby, jejich listy může pokrývat různě tlustá kutikula, mohou mít impregnované buněčné stěny nebo schopnost ukládat více vody. S obranou proti stresu souvisí u přizpůsobení životních cyklů. Výše zmíněné obranné mechanismy jsou označovány jako pasivní. Aktivní obranu rostlin lze velmi zjednodušeně přirovnat k lidské reakci na stres. Po přijetí podnětu a narušení buněk dochází k poplachové fázi a ta poté spouští kompenzační mechanismy restituční fáze. Odolnost rostliny se vůči stresoru zvýší a rostlina se nachází ve fázi rezistence. Některé obranné mechanismy mají trvalý charakter, jiné rostlinu po čase uvedou do fáze vyčerpání. Toto schéma reakce na stres je na obr. 3. Takovéto snahy o udržení stálého vnitřního prostředí nemohou probíhat bez spotřeby energie, proto probíhají na úkor jiných, zejména syntetických procesů. Rostlina přestane nabírat biomasu a veškerou energii, včetně té ze štěpení ATP, využívá na obranu proti stresorům, a to dokonce i nějakou dobu po ukončení jejich působení. Působení stresorů ale nemusí mít pro rostlinu čistě negativní důsledky. Například snížení teploty je stresor nezbytný pro rozmnožování a přežití rostlin přes zimní období. Bez podobných stresových faktorů by nemohla proběhnout evoluce jakéhokoliv organismu [14].



Obr. 3 Průběh stresové reakce rostlin [14].

2.3 Metody analýzy studovaných látek

Aby bylo možné studované látky v buňce stanovit, je třeba zvolit vhodnou metodu jejich extrakce z buňky, při které nedojde k jejich zničení, a budou ve vzorku obsaženy v detekovatelném množství. K samotnému stanovení je dále třeba zvolit takovou analytickou metodu, která je dostatečně citlivá, nenáročná na zpracování většího počtu vzorků a není náchylná ke vzniku velké statistické chyby.

2.3.1 Extrakce

Extrakce je obvykle časově nejnáročnější a nejvíce pracná část experimentu. Způsob extrakce je v ideálním případě zvolen tak, aby byla metoda jednoduchá na provedení, rychlá, finančně nenáročná a výtěžek studovaných látek byl dostatečně vysoký bez větších ztrát nebo poškození. Získaný produkt extrakce by nemělo být třeba dále upravovat nebo zakoncentrovávat [15].

Principem extrakce je distribuce složek mezi dvě nemísitelné fáze, založená na selektivní rozpustnosti studovaných látek v rozpouštědlech. Rozlišujeme několik typů extrakcí. Extrakce tuhé látky kapalinou je hojně využívána pro přírodní materiály. Vzorek je nejprve nutné homogenizovat a následná extrakce je obvykle provedena

v Soxhletově extraktoru, ve kterém se dá extrakce opakovat, a tím zvýšit výtěžek studované látky. U extrakce z kapaliny do kapaliny je nutné, aby přecházející látka byla elektroneutrální. Výběr extrakčních podmínek je tedy komplikovanější než u extrakce tuhé látky kapalinou. V případě protolytických organických látek, tedy kyselin a zásad, je nutné extrakci provádět ve vhodném rozmezí pH, a v případě látek anorganických je podmínka elektroneutrarity splněna jejich převedením na cheláty nebo iontové asociáty [16].

Úspěch extrakce závisí na několika faktorech, konkrétně na zvoleném rozpouštědle, podmínkách ve vodné fázi a technice extrakce. Rozpouštědlo musí být vždy zvoleno tak, aby nenarušovalo stanovení studované látky, zejména u fotometrických metod má tato podmínka vysokou prioritu. Pokud je extrakce například použita jako prekoncentrační metoda, pak by zvolené rozpouštědlo mělo mít nízký bod varu k jeho snadné destilaci. Dále by rozpouštědlo nemělo být toxické, hořlavé nebo příliš drahé [16].

2.3.1.1 Extrakce nukleotidů z rostlinné matrice

ATP extrahované z živých materiálů je extrémně labilní a velmi rychle se rozkládá, proto je vývoj vhodné extrakční metody klíčový pro průběh celého stanovení. Nutnost předběžné separace nukleotidů od asociovaných sloučenin vede již v základu ke ztrátě asi 50 % nukleotidů. Další komplikací při stanovení těchto látek z rostlinných materiálů jsou fenolické sloučeniny, které mají chromatografické chování podobné jako ATP. Jejich odstranění ze směsi nukleotidů vyžaduje použití dalších separačních technik, což také vede k rozkladu ATP. Vzhledem k nestabilitě fosfátových skupin v ATP je tedy nutné volit co nejjednodušší metody, které lze provést v co nejkratším čase. Při vývoji celé metody stanovení je tedy třeba se zaměřit zejména na způsob extrakce, koncentraci tkáně ve vzorku a metody fixace a uchovávání rostlinného materiálu [17].

Pro extrakci nukleotidů bylo vyvinuto několik různých metod, které využívají různá rozpouštědla a provádí se buď za horka, nebo v chladu. K získání celého množství ATP obsaženého ve vzorku ke stanovení je nutné zvolit vhodné rozpouštědlo, které je schopné okamžitě usmrtit buňky zároveň s úplnou precipitací proteinů a inaktivací enzymů ze skupiny *ATPas* [18].

Obvyklé metody přípravy vzorků před jejich analýzou zahrnují srážení bílkovin, extrakci z kapaliny do kapaliny, tedy LLE extrakci, a extrakci na pevné fázi, neboli SPE extrakci. Nukleotidy jsou ve vodě extrémně rozpustné a je tedy obtížné je distribuovat z vodné fáze do organických, jako jsou například chloroform a ethylacetát. Proto se jako vhodná metoda nedoporučuje extrahovat analyt z vodných vzorků pomocí organických rozpouštědel. Srážení bílkovin lze snadno provést organickými rozpouštědly nebo kyselinou chloristou. Pro zpracování vzorků z komplexních matric je vhodná SPE extrakce. Lze u ní vyvinout specifickou metodu, která bude obsahovat vhodný sorbent pro konkrétní stanovení [19].

Před samotnou extrakcí jsou rostlinné vzorky obvykle zmrazeny pomocí tekutého dusíku, rozetřeny na prášek a smíseny s vhodným rozpouštědlem. Jednou z vhodných metod extrakce je například pomocí chlazeného roztoku trichloroctové kyseliny, průběh celé extrakce je při nízkých teplotách, aby se zabránilo aktivitě enzymů a labilní fosfátové skupiny zůstaly zachovány. Extrakce pomocí vařícího ethanolu nebo vody jsou často spojovány s diskuzí ohledně velké stimulace enzymů pomocí vysoké teploty těsně před usmrcením buňky, což může vést k nežádoucímu štěpení nukleotidů. Naopak metoda zmrazeného materiálu byla prokazatelně náchylnější na následné změny teploty při manipulaci se vzorky, jejichž obsah byl i při malé změně velmi rychle štěpen [20,21].

2.3.2 Metody stanovení adenosinových nukleotidů

Způsobů, jakými lze stanovit adeninové nukleotidy, je několik a volba správné metody je ovlivněna mnoha faktory. Takovým faktorem může být například přítomnost jiných biomolekul ve vzorku, které by mohly stanovení narušovat nebo dokonce zcela znemožnit. Dalším faktorem je také technické zázemí a aparatura, kterou má daná laboratoř k dispozici. Všechny metody mají své výhody i nevýhody a je tedy třeba vybrat, případně experimentálně prokázat, která metoda se pro stanovení adeninových nukleotidů v konkrétním vzorku hodí nejvíce.

2.3.2.1 Bioluminiscenční metody

Jedna z hojně využívaných metod pro stanovení adeninových nukleotidů je za pomoci enzymu *luciferasy*, který využívají živočichové z čeledi světlušek. Výhodou této metody je její vysoká citlivost, selektivita a poměrně snadné provedení. Reakce luciferinů a *luciferas* byly objeveny již v roce 1884, ale pro stanovení ATP pomocí *luciferasy* je využil McElroy až v roce 1947. V reakci katalyzované *luciferasou* je *D*-luciferin za přítomnosti ATP oxidován na oxyluciferin, přičemž vzniká jako vedlejší produkt viditelné světlo. Aby reakce proběhla, musí být přítomen kyslík, substrát pro enzym luciferin, enzym *luciferasa*, ATP a hořečnaté ionty. Vysokou citlivostí metody lze bioluminiscenci využít pro stanovení intracelulárního ATP, ale v důsledku degradace buňky jsou vyžadovány další kroky doprovázející samotnou metodu, které udrží buněčné prostředí stabilní a zabrání enzymům v hydrolýze ATP. Nevýhodou této metody je rušení stanovení intracelulárního ATP přítomností extracelulárního ATP, jehož koncentrace může být vyšší až o několik řádů. Dále stanovení výrazným způsobem narušují anorganické ionty. Metoda bioluminiscence je vhodná hlavně pro stanovení ATP, ale méně vhodná pro stanovení AMP a ADP [22].

2.3.2.2 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou vhodné zejména pro stanovení nukleotidů ve směsích. Používají se separace pomocí iontově-výměnné chromatografie, vysokotlaké kapalinové chromatografie, tedy HPLC, s reverzní fází nebo iontově párovou HPLC a pro stanovení ATP také chromatografie na tenké vrstvě. Nevýhoda iontově výměnné chromatografie je nízká stabilita kolon, proto není separace vždy zcela reprodukovatelná [23].

U HPLC s reverzní fází lze použít isokratickou nebo gradientovou eluci. Při eluci isokratické se obvykle používá fosforečnanový nebo citrátový pufr, gradientová eluce se provádí pomocí acetonitrilu, methanolu nebo jejich směsí. Isokratická eluce může být dokonce provedena směsí fosforečnanového pufru s acetonitrilem nebo methanolem, což ve správně zvoleném poměru může vést ke zrychlení analýzy. Jako párový ion se v iontově párové HPLC obvykle využívá tetrabutylammonium nebo triethylamin. Z výhod všech chromatografických metod lze uvést například možnost provádět separaci

a současné stanovení nejen nukleotidů, ale také nukleosidů, dusíkatých bází nebo kreatinu. Nukleotidy se detekují pomocí UV záření v rozmezí 210 nm až 254 nm nebo fluorescenčním zářením [23].

2.3.2.3 Fluorescenční metody

Fluorescence nemusí být užívána pouze jako detekční technika při chromatografickém stanovení, ale i jako nezávislá analytická metoda. Fluorescenční metody pro stanovení ATP využívají zvýšení fluorescence nebo naopak fluorescenční zhášení. Stanovení zvýšenou fluorescencí je založeno na zvýšení fluorescence komplexů vzácných zemin, jako jsou terbium a europium, s doxycyklinem, norfloxacinem, oxytetracyklinem a fenantrolinem v přítomnosti ATP [24].

2.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná chromatografie patří mezi chromatografické metody, což je souhrnné označení metod, které umožňují separaci různých druhů molekul ze směsi. Tyto metody nachází využití v mnoha oborech spojených s laboratorní nebo průmyslovou praxí. Obecně je jimi analyzován vzorek, který se skládá z analytu, tedy hledané látky, a matrice, což jsou všechny látky ve směsi kromě analytu. Chromatografická separace odděluje analyt od matrice zavedením vzorku do mobilní fáze a její průchod přes fázi stacionární, která zadržuje a zpožďuje molekuly prostřednictvím různých interakcí. Pokud je mobilní fází metody plyn, pak mluvíme o plynové chromatografii, tedy GC, a pokud je touto fází kapalina, nazýváme ji kapalinovou chromatografií, tedy LC [25].

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii je stacionární fáze obsažena v kolonách a mobilní fáze je jimi vedena za zvýšeného konstantního tlaku pomocí čerpadla. Vzorek je ručně nebo pomocí autosampleru nadávkován jehlou do mobilní fáze před začátkem kolony v objemu řádově několik μl . Po nástřiku putuje vzorek s jednotlivými složkami kolonou a vytváří se eluční pás, poté zachytem na stacionární fázi dochází k separaci na zóny jednotlivých složek. Po uvolnění složky z kolony zaznamená její signál detektor a zapíše jej do chromatogramu v podobě chromatografického píku. Každá látka poskytuje vlastní eluční křivku, pík, jehož

retenční čas je pro každou látku charakteristický. Složení mobilní fáze ovlivňuje její eluční sílu. Při isokratické eluci zůstává složení mobilní fáze, a tedy i eluční síla, po celou dobu analýzy stejné. Eluci, při které se s časem eluční síla a složení mění, nazýváme gradientová. Gradientová eluce se nejčastěji využívá při separaci směsí látek, které by se při isokratické eluci výrazně lišily svými retenčními časy a analýza by trvala dlouhou dobu [26].

2.3.3.1 Typy HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie může být dále rozdělena podle různých kritérií. Jednotlivé typy se liší povahou stacionární nebo mobilní fáze, druhy interakcí zodpovědných za separaci nebo například rozsahem koncentrací jednotlivých složek v mobilní fázi. Každý typ HPLC má jiné vlastnosti a možnosti využití. Před analýzou hledané látky je třeba tyto rozdíly znát a pro separaci nebo analýzu rozhodnout, který typ je pro daný experiment vhodný. Tato kapitola bude zaměřena pouze na některé významné typy HPLC.

Často používaným typem je HPLC na obrácené, reverzní, fázi, tedy RP-HPLC. V dnešní praxi je používána častěji než HPLC na normální fázi, jelikož má její mobilní fáze vyšší teploty varu a menší hořlavost. Na rozdíl od chromatografie na normální fázi tvoří mobilní fázi v RP-HPLC směs polárních rozpouštědel a stacionární fáze je naopak nepolární. Stacionárních fází je k dispozici velké množství a většinou jsou tvořeny dlouhým uhlíkatým řetězcem na pevném podkladu, například silikagelu. Mobilní fáze je většinou směsí organických rozpouštědel, jako třeba methanolu a vody, acetonitrilu a vody nebo isopropanolu a vody. Také lze přidat malé množství pufru. Interakce v RP-HPLC jsou obvykle hydrofobní, tudíž látky s větším hydrofobním povrchem jsou v koloně zadržovány déle. Široké využití HPLC na reverzní fázi je založeno na faktu, že většina sloučenin ve své struktuře obsahuje nějakou hydrofobní skupinu [25].

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie neboli HILIC je metoda vhodná pro polární slabé kyseliny nebo zásady. Stacionární fáze je zde polární a mobilní fáze je méně polární než stacionární fáze a bývá obvykle kombinací vody nebo pufru s organickým rozpouštědlem. Separace pak probíhá na základě rozdílů polarit mezi molekulami nebo mechanismem iontové výměny. Tento typ HPLC se používá zejména při separaci sacharidů, peptidů nebo aminokyselin [27].

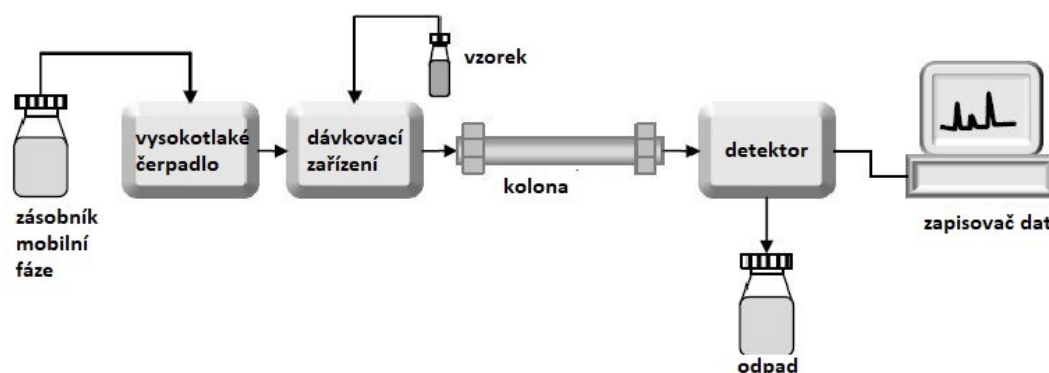
Iontově párová chromatografie neboli IPC se využívá při separaci iontů nebo silně polárních látek. Je to metoda velmi podobná RP-HPLC, od které se liší speciálním typem mobilní fáze. Přidává se do ní činidlo interagující s ionty analytu a tvoří s nimi méně polární sloučeniny, které poté mohou být separovány na základě hydrofobních interakcí se stacionární fází. Například ionizované kyseliny vytvoří s činidlem iontové páry přístupné k separaci na RP-HPLC [25].

V iontové výměnné chromatografii, IEC, je retence založena na interakci mezi ionty obsaženými v roztoku a opačně nabitými ionty navázanými na stacionární fází. V tomto typu HPLC jsou skupiny iontů zadržovány v koloně na základě coulombických interakcí [27].

Gelová filtrační chromatografie neboli GFC k separaci využívá velikost molekul, přesněji řečeno jejich hydrodynamický objem. Jako mobilní fáze se zde využívají vodné roztoky, a tudíž je tato metoda vhodná pro látky ve vodě rozpustné nebo polární. V gelové filtrační chromatografii se jako stacionární fáze využívají porézní částice s různě velkými póry. Molekula analytu menší než velikost pórů vstoupí do stacionární fáze a poté jí putuje pomocí kanálů. Čím menší molekula je, tím delší dobu ve stacionární fází stráví. Molekuly větší než velikost pórů nejsou stacionární fází zpomalovány [25,27].

2.3.3.2 Instrumentace HPLC

HPLC systém může být dle výrobce a účelu různě pozměňován, ale základní prvky a jejich pořadí by měly být zachovány vždy stejné. Schéma stručného zapojení se nachází na obr. 4. Většina schémat začíná jedním nebo více zásobníky mobilní fáze, ze kterých putuje mobilní fáze buď rovnou na vysokotlaké čerpadlo a poté do směšovače, kde se podle programu smísí více kapalin, nebo naopak nejdříve do směšovače a poté na čerpadlo. Každé čerpadlo je opatřeno systémem tlumícím tlakové pulsy. Dále je mobilní fáze vedena přes dávkovač, kde je do ní vstříknut vzorek, do chromatografické kolony. Kolona je obvykle nerezová nebo z velmi pevného skla a je napojena na detektor. Z detektoru je zachycený signál poslán přímo do zapisovacího zařízení, kterým bývá obvykle počítač s vhodným softwarem pro práci s daným přístrojem. Jak už toho zapojení napovídá, HPLC přístroje bývají robustní a jejich přenos je velmi obtížný [16].



Obr. 4 Stručné schéma HPLC systému [28].

2.3.3.3 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie je využívána pro separaci nabitých látek. Tyto látky jsou reversibilně vázány nabitými funkčními skupinami kovalentně navázanými na nosič stacionární fáze. Klíčem iontové separace je rovnováha mezi mobilní a stacionární fází. Při separaci v iontové výměnné chromatografii se mohou uplatňovat dva mechanismy záchytu analytu. První mechanismus je založen pouze na rozdílu v afinitě analytů ke koloně. Eluce při tomto mechanismu využívá mobilní fázi nesoucí ionty, které soupeří s ionty analytu o vazby na koloně a nakonec je ve vazbách nahradí. Protože afinita kompetitivních iontů ke stacionární fázi je nižší než afinita analytu, je k dosažení eluce potřeba jejich dostatečná koncentrace v mobilní fázi. Druhý mechanismus je založen na přidání komplexotvorného činidla do mobilní fáze. Toto činidlo mění formu analytů, ve které jsou zpočátku přítomny a mění je tak, aby byly na stacionární fázi zadržovány odlišně [25].

Měníče iontů, tedy ionexy, lze klasifikovat podle různých kritérií. Obecně se jedná o nerozpustné látky, které reversibilně vyměňují ionty mezi mobilní fází a stacionární fází. Mohou to být materiály organické i anorganické, a to přírodního nebo umělého původu. Nejdůležitější hledisko rozdělení je ale podle skupin iontů, které vyměňují. Iontové měniče měnící kationty se nazývají katexy a obvykle jsou to polymerní nerozpustné kyseliny, obsahující různé skupiny podle kyselosti. Pro silně kyselé katexy se používají látky se sulfoskupinami, pro slabší například karboxylovou funkční skupinou. Anexy naopak vyměňují anionty, tedy látky záporně nabitě, a jedná se tudíž o báze. Používají se zde funkční skupiny jako například kvartérní aminy nebo méně

bazické amino skupiny. Existují také amfortermní ionexy, obsahující funkční skupiny katexů i anexů a tvořící vnitřní soli [26].

Anorganické ionexy jsou vhodnou volbou pro analýzy, při kterých je třeba práce ve vysokých teplotách nebo použití radiace. Příkladem anorganického ionexu jsou třeba silikagely, dihydrogenfosforečnan zirkoničitý nebo hlinitokřemičitany. O něco méně tepelně odolné, ale s velkou stabilitou v širokém rozmezí pH jsou ionexové pryskyřice. Jejich povrch se dá snadno upravovat navázáním různých funkčních skupin a jsou chemicky stabilní. Příklady takových syntetických pryskyřic jsou polymery na bázi styrenu nebo akrylátové ionexy. Z přírodních organických látek se k výrobě ionexů používá celulóza, dextran nebo agarosa [29].

Jako mobilní fáze se v IEC používají zejména pufrů. Je velmi důležité vybrat pro analýzu vhodné složení pufru. Pokud pufr obsahuje nesprávný protiion, může zabránit vazbě analytu na kolonu. Například fosforečnanový pufr se hojně využívá pro purifikaci proteinu, není ho ale vhodné použít v anexové chromatografii, protože fosforečnany silně reagují s kladně nabitými anexovými pryskyřicemi [30].

K detekci signálů se při IEC používají například UV spektrometrické, refraktometrické, vodivostní nebo elektrochemické detektory [29].

2.3.3.4 Problémy a doporučení v laboratorní praxi

Vysokotlaká kapalinová chromatografie je v dnešní době jednou z nejrozšířenějších separačních metod v mnoha laboratorních odvětvích zapojených do vývoje nebo rutinní praxe. Proto bylo vydáno mnoho průvodců a publikací pojednávajících o tom, jak udržet metodu efektivní, prodloužit životnost jednotlivých částí přístroje a jak řešit možné vzniklé problémy při vyhodnocování samotné analýzy.

Mnoho problémů při použití HPLC vzniká již u přípravy mobilní fáze. V první řadě je nutné používat rozpouštědla o nejvyšší možné čistotě a vybírat taková, která nebudou narušovat samotnou detekci. Každá připravená mobilní fáze musí být před použitím zfiltrována přes filtr s póry o velikosti maximálně 0,45 μm . Tento krok je velmi důležitý při práci s vodou a pufrů. Pokud je používán pufr, je třeba také dbát na to, aby se nesrážel s organickou složkou mobilní fáze, obzvláště tehdy, když pro analýzu využíváme pro mísení mobilní fáze program a dochází k němu tedy až v přístroji. Voda pro HPLC musí být za každých podmínek deionizovaná, nikoliv destilovaná, ve které se

nachází organické nečistoty a ty by mohly narušit analýzu nebo vést k růstu bakterií. V každém případě je třeba mobilní fázi udržovat v perfektní kondici a při sebemenších pochybách o znečištění nebo počátku mikrobiálního růstu připravit do zásobní láhve nový roztok [31].

Při samotné analýze může docházet k mnoha jevům, které mohou vést k nepřesnosti metody nebo dokonce k úplnému znemožnění vyhodnotit výsledný chromatogram. Problémy mohou vznikat již v základní linii chromatogramu, kde se mohou vytvářet šum a drift základní linie nebo její cyklický průběh v podobě vln. Dále z podobných důvodů může začít kolísat nebo se měnit retenční čas analytů. Výsledky analýzy se zaznamenávají na chromatogram v podobě píků. Aby bylo možné takové píky vyhodnotit, musí být dobře rozlišené a symetrické. Jedním z nejčastějších problémů bývá dvojitý pík. Způsobovat ho může mnoho faktorů, které ale není příliš složité odstranit. Těmito faktory mohou být kontaminovaná nebo degradovaná kolona, dvojitá rovnováha chemických forem analytů, nekompatibilní rozpouštědlo vzorku s mobilní fází, mrtvý objem nebo netěsnost v systému, případně příliš vysoký nadávkovaný objem. Vysoký nadávkovaný objem a nekompatibilní rozpouštědlo jsou také původci frontujících píků. Chvostující pík může být způsoben opět kontaminovanou nebo degradovanou kolonou. Na základní linii se také může vytvořit negativní pík. Pokud je pouze jeden, může to být důsledek použití IEC, kdy nebyl vzorek rozpuštěn v mobilní fázi. Dále je možné, že má mobilní fáze příliš vysokou absorpci při UV detekci, a tím ruší stanovení. Pokud je na chromatogramu více píků, než bylo předpokládáno, jedná se nejspíše o kontaminaci vzorku, mobilní fáze nebo rozpouštědla vzorku, případně se analyt začal rozkládat [31].

Protože HPLC probíhá za zvýšeného tlaku, je třeba jej stále sledovat. Obvykle přístroje mívají systémy, které při překročení určitého tlaku v jakékoliv činnosti okamžitě zastaví průtok, aby nedošlo k poškození. Pokud ale není závada nalezena a odstraněna, není možné v analýze dále pokračovat. Obvykle se jedná o mechanické závady částí systému, kterými prochází mobilní fáze, například ucpané kapiláry, filtry, frity nebo kolona, případně je problém s písty čerpadla. Pokud tlak výrazně kolísá, mohou být nefunkční ventilký čerpadla nebo písty, případně zavzdušněná hlava čerpadla, která souvisí většinou s odplyňovačem mobilní fáze [31].

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda
- Methanol Chromasolv pro HPLC, Sigma – Aldrich, Francie
- Acetonitril, gradient grade, Merck, Německo
- Hydroxid draselný 85% p.a., Penta, s.r.o., ČR
- Dihydrogenfosforečnan draselný 99% p.a., Lach-Ner, s.r.o., ČR
- Adenosin-5'-monofosfát sodná sůl 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Adenosin-5'-difosfát sodná sůl 95%, Sigma-Aldrich, Německo
- Adenosin-5'-trifosfát sodná sůl 90%, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina chloristá 70% p.a., Penta, s.r.o., ČR

3.2 Instrumentace

- HPLC přístroj, Waters 2690 Alliance, USA
- Detektor DAD, Waters 996, USA
- Chromatografická kolona, VA 50/4,6 Nucleogel SAX 1000-8, Marcherey-Nagel, Německo
- Chromatografický software Empower 3, Waters, USA
- Automatické pipety, Biohit Proline, BIOHIT, Finsko (10-100µl a 100-1000µl)
- Analytické váhy, Sartorius 2004 MP, Německo
- Analytické váhy, NBL-254i Nimbus, Adam Equipment, Velká Británie
- pH metr AD1000 pH/mV and Temperature meter, Adwa, Maďarsko
- Membránové filtry Nylon 66, velikost pórů 0,45 µm, Supelco, Tchaj-wan
- Přístroj na deionizovanou vodu, Milli-Q plus, Millipore, USA
- Vialky se septem pro HPLC přístroj
- Centrifuga Minispin plus, Eppendorf
- Třepačka Vibramax 100, Heidolph

3.3 Rostlinný materiál

- Lyofilizované listy tabáku rodu *Nicotiana tabacum* L.

3.4 Pracovní postup

3.4.1 Příprava mobilní fáze

Pro analýzu byla používána směs čistého acetonitrilu a $0,2\text{mol/dm}^3$ roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného. Navážka na 1 l roztoku pufru činila 27,22 g KH_2PO_4 a byla doplněna v odměrné baňce po rysku deionizovanou vodou. Následně bylo pH roztoku upraveno na hodnotu $\text{pH} = 5,0$ pomocí 1mol/dm^3 hydroxidu draselného, který se připravoval rozpuštěním 1,403 g ve 25 ml deionizované vody. Takto připravený roztok byl poté zfiltrován na vakuové filtrační sestavě, aby případné drobné nečistoty neucpaly chromatografický systém. Pro filtraci byly použity membránové filtry s velikostí pórů $0,45\text{ }\mu\text{m}$ nebo menší. Připravený pufr byl uchováván v lednici kvůli mikrobiální degradaci.

3.4.2 Příprava standardů

Standardy AMP, ADP a ATP pro měření kalibrační závislosti a opakovatelnosti byly rozpouštěny v $0,05\text{mol/dm}^3$ KH_2PO_4 , jehož pH bylo upraveno na hodnotu $\text{pH} = 7,5$. K sestrojení kalibračních křivek byly připraveny ředící řady pro všechny tři nukleotidy v rozsahu $0,0002\text{ mg/ml}$ až 1 mg/ml . Pro první analýzu bylo pro řadu 1 až $0,2\text{ mg/ml}$ naváženo potřebné množství do 1 ml vialek a z této řady byly vytvářeny další řady pomocí desetinásobného zředění. Tato metoda byla zatížena velkou chybou, proto byl zvolen postup, při kterém byl navážen pouze 1 mg do 1 ml a z tohoto zásobního roztoku byla vytvořena první řada pro následné ředění. Vzorky byly mimo měření vždy co nejrychleji umístěny do mrazáku.

Vzorky standardů byly dávkovány na kolonu 3x v objemu $2\text{ }\mu\text{l}$. Kolona byla udržována při $30\text{ }^\circ\text{C}$ a průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min .

3.4.3 Extrakce

Pro tuto bakalářskou práci byly při extrakci adenosinových ribonukleotidů využity lyofilizované listy tabáku rodu *Nicotiana tabacum L.*, zhomogenizované na jemný prášek v třecí misce. Listy byly uchovávány při laboratorní teplotě. Na rozdíl od diplomové práce Mgr. Markéty Konečné byla v této bakalářské práci vyvíjena metoda extrakce s chlazenými rozpouštědly nebo v ledu. [32]

Pro první extrakční postup bylo naváženo 20 mg zhomogenizovaného vzorku a toto množství bylo poté přidáno k 500 μl chlazeného čistého methanolu. Tato směs byla 1 min třepána v ruce, aby došlo k inaktivaci enzymů a precipitaci proteinů. Poté bylo přidáno 500 μl chlazené deionizované vody. Takto vzniklá směs byla ponechána 3 min na třepačce a poté 10 min centrifugována rychlostí 14500 rpm. Dále byl supernatant přefiltrován přes filtr upevněný na injekční stříkačku do vialky a vzorek byl vložen do autosampleru k analýze.

Druhý extrakční postup byl podobný prvnímu, ale obě fáze třepání probíhaly na třepačce, přičemž vzorek byl po celou dobu umístěn v kádince s ledem a krok centrifugace byl vynechán z důvodu zahřívání vzorku. Vzorek byl před analýzou pouze filtrován přes filtr na stříkačce.

Pro další extrakční postup byla zvolena extrakce dihydrogenfosforečnanovým pufrem namísto vody. Vzorek byl opět třepán 1 min v ruce s nechlazeným methanolem, a poté k němu bylo přidáno 500 μl 0,05mol/dm³ chlazeného dihydrogenfosforečnanového pufru o pH = 7,5. Extrakce na třepačce probíhala 4 min a vzorek byl opět před analýzou zfiltrován. Stejný postup byl proveden i při nahrazení methanolu acetonitrilem ve stejném poměru s pufrem.

Dalším vyzkoušeným postupem byla extrakce mobilní fází používanou pro separaci standardů nukleotidů. K 20 mg tabákového prášku bylo přidáno 400 μl chlazeného acetonitrilu a směs byla 1 min třepána v ruce. Poté bylo napipetováno 600 μl KH₂PO₄ o pH = 5,0 a takto připravená směs byla 4 min extrahována na třepačce v kádince s ledem.

Jako další byla provedena extrakce 1,5mol/dm³ kyselinou chloristou připravenou ze zásobní lahve (w = 70%) smísením 13 ml s 87 ml deionizované vody. Pro následné úpravy pH byl také připraven 5mol/dm³ roztok KOH, jehož navážka 7,013 g byla rozpuštěna v 25 ml deionizované vody. Do plastové uzavíratelné vialky

(tzv. Eppendorfký) bylo naváženo 20 mg tabáku a k nim přidán 1 ml roztoku HClO_4 . Za pokojové teploty byla tato směs 2 minuty extrahována na třepačce. Poté byl vzorek přefiltrován a jeho pH bylo za pomoci 5mol/dm^3 KOH upraveno z velmi kyselého na neutrální. Před analýzou bylo nutno vzorek znovu zfiltrout z důvodu tvorby sraženiny při neutralizaci. Tento postup byl zopakován také v kádince s ledem a krátkou centrifugací k usazení sraženiny. Taktéž bylo zvýšeno množství vzorku na 200 mg s vložím 15 min centrifugace.

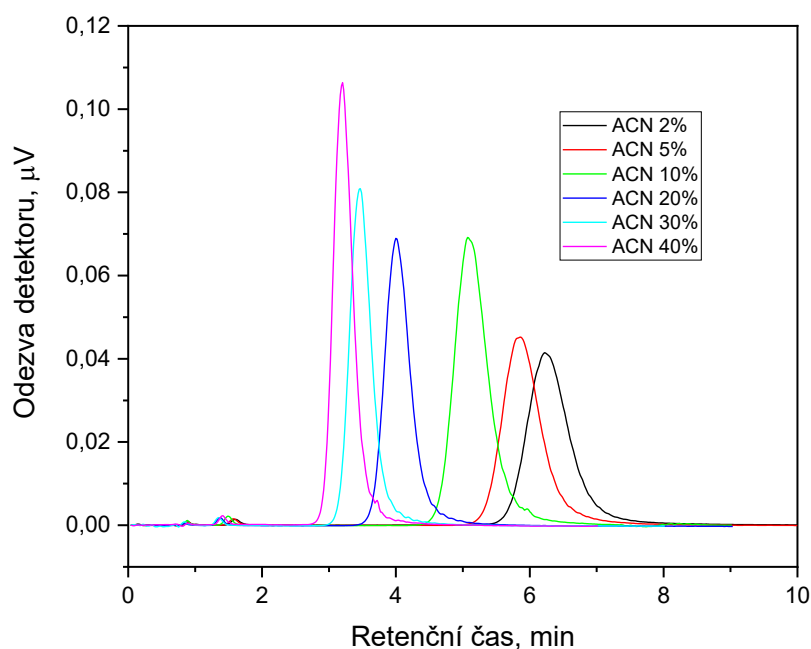
Při posledním extrakčním postupu byl ke vzorku tabákových listů přidán standard ATP ke zjištění účinnosti extrakční techniky, případně stupně degradace analytů vlivem použitého extrakčního postupu, jak s využitím methanolu, tak kyseliny chloristé. V případě methanolu bylo 20 mg tabáku třepáno s 500 μl chlazeného methanolu v kádince s ledem po dobu 1 min a extrakce probíhala s 500 μl deionizované vody obsahující standard ATP o koncentraci 1 mg/ml po dobu 3 min. Extrakt byl zfiltrout, analyzován a 60 min ponechán při pokojové teplotě k ověření inaktivace enzymů. Pro postup s kyselinou chloristou byl k 20 mg vzorku přidán 1 ml HClO_4 a 500 μl roztoku standardu ATP o koncentraci 1 mg/ml. Tato směs byla ponechána 2 min na třepačce, zfiltrout a její pH bylo 5mol/dm^3 KOH upraveno na neutrální.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace experimentálních podmínek

Složení mobilní fáze a experimentální podmínky vycházely z diplomové práce Mgr. Markéty Konečné [32] a cílem optimalizace byla vyšší citlivost metody, zlepšení tvaru píků a zrychlení analýzy. Detekce byla na základě naměřených absorpčních spekter prováděna při 260 nm. Tato vlnová délka byla zvolena v části absorpčního spektra, kde analyty poskytovaly největší odezvu a také proto, že je pro adenosinové ribonukleotidy, na rozdíl od 220 nm, charakteristická. Eluce byla zvolena na základě výše zmíněné diplomové práce isokratická a základ mobilní fáze tvořil 0,2mol/dm³ KH₂PO₄. Metody optimalizace byly zaměřeny zejména na pík ATP, který měl dlouhou dobu eluce a byl rozmytý.

Jako první byla vyzkoušena isokratická eluce mobilní fází, která byla tvořena pufrem 0,2mol/dm³ KH₂PO₄ o pH = 5,0 a methanolem. Poměr methanolu byl postupně zvyšován. Metoda začínala na 2 % objemového zastoupení methanolu a byla zvyšována na 5, 10, 20, 30 a 40 objemových %. Více než 40 % methanolu nebylo testováno kvůli riziku srážení pufru s organickým rozpouštědlem, které by vedlo k ucpání chromatografického systému. Při zastoupení 40 objemových % methanolu došlo k mírnému zrychlení píku ATP, ale jeho tvar ani výška se nezměnily. Jako další byl vyzkoušen podíl čistého acetonitrilu namísto methanolu a tento podíl byl zvyšován ve stejných poměrech jako methanol. Při 40 objemových % acetonitrilu v mobilní fázi došlo k výraznému zrychlení píku, ke zvýšení citlivosti a také k zúžení píku, proto byl tento poměr vybrán pro další analýzu. Na obr. 5 je vidět, jak se postupně zrychlovala analýza a zlepšoval tvar píku ATP s rostoucím obsahem ACN v mobilní fázi.



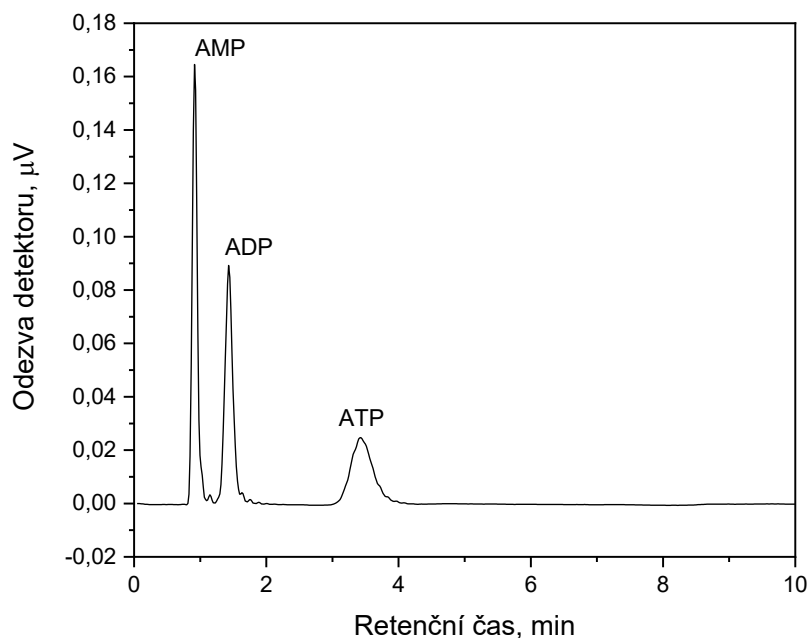
Obr. 5 Chromatogram znázorňující optimalizaci složení mobilní fáze zvyšováním objemových % acetonitrilu. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem, průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 260 nm.

Dále byl sledován vliv koncentrace fosforečnanového pufru na chování analytů, konkrétně byla použita koncentrace fosforečnanového pufru 0,1 mol/dm³ a 0,05 mol/dm³, ale při použití těchto pufrů s nižší koncentrací se zhoršilo rozlišení píků AMP a ADP, proto byla koncentrace dihydrogenfosforečnanového pufru ponechána na 0,2 mol/dm³.

Další podmínky analýzy byly ponechány stejné jako v diplomové práci Mgr. Markéty Konečné. Teplota kolony byla 30 °C, průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min a objem nástřiku činil 2 µl. Tlak na koloně se po dobu analýzy pohyboval mezi 400 – 450 psi. Separace probíhala na chromatografické koloně Nucleogel SAX 1000-8. [32]

Na obr. 6 je znázorněn ukázkový chromatogram směsi standardů AMP, ADP a ATP změřený za optimalizovaných podmínek. Na tomto chromatogramu je vidět, že

všechny tři sledované nukleotidy bylo možné rozdělit až na základní linii během 4 minut.



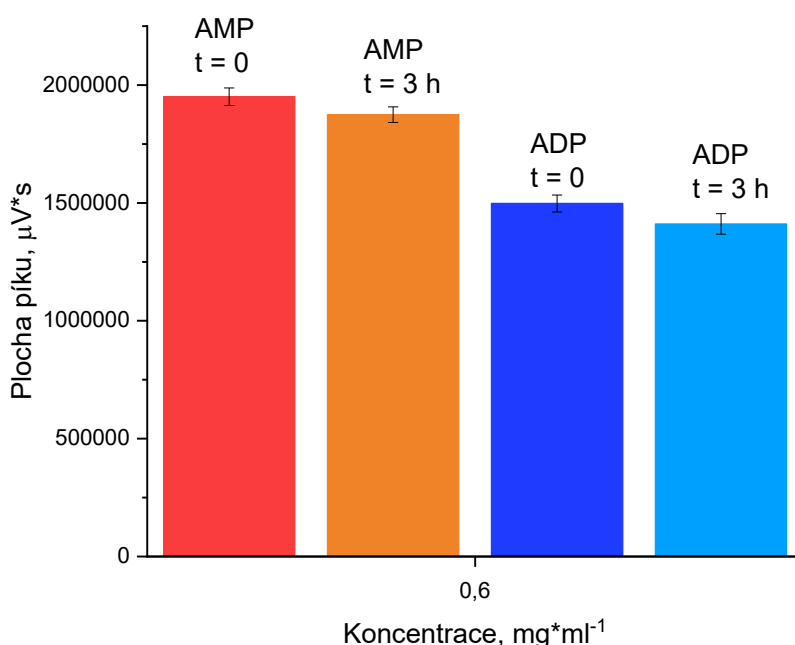
Obr. 6 Chromatogram směsi standardů AMP, ADP a ATP v mobilní fázi obsahující 40 objemových % acetonitrilu. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 260 nm.

4.1.1 Opakovatelnost měření vzorků standardů

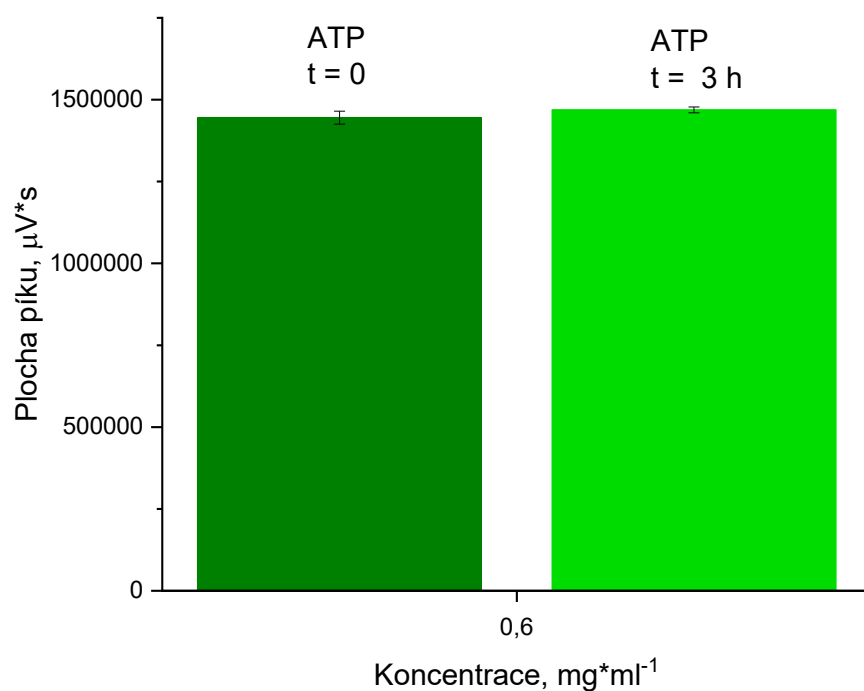
Podmínky uchovávání roztoků standardu byly převzaty z diplomové práce Mgr. Markéty Konečné. Všechny vzorky standardů AMP, ADP a ATP byly připravovány v pufru KH₂PO₄ o koncentraci 0,05 mol/dm³ a pH = 7,5, ve kterém byla jejich stabilita největší. Mimo nezbytnou manipulaci byly standardy i jejich roztoky umisťovány do mrazáku [32].

Před vlastním měřením kalibračních závislostí pro standardy AMP, ADP a ATP byla sledována opakovatelnost dávkování roztoků standardů na dvou koncentračních hladinách, a to 0,6 mg/ml a 0,006 mg/ml. Výše uvedené roztoky všech tří

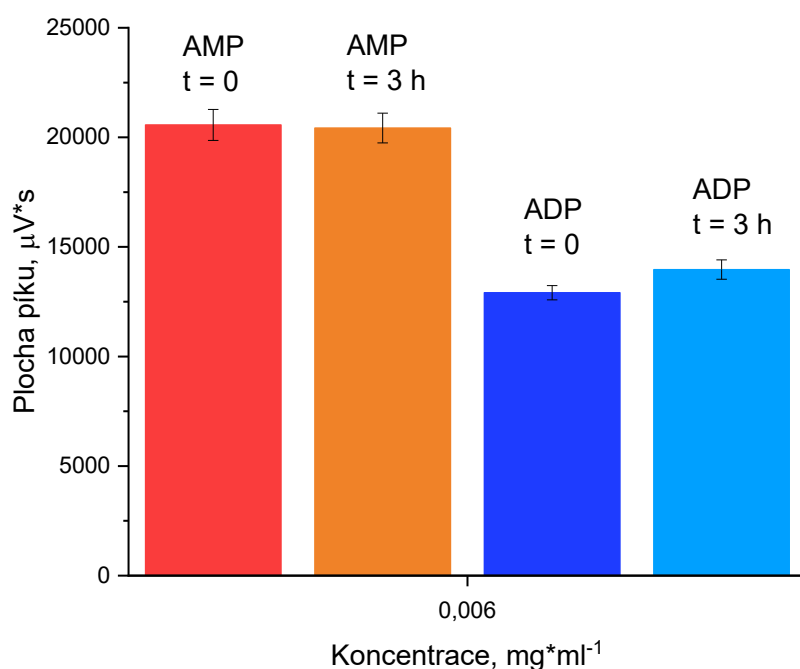
adenosinových ribonukleotidů byly nadávkovány vždy desetkrát. Měření všech připravených roztoků standardů bylo zopakováno po 3 hodinách, roztoky standardů byly mezi měřeními ponechány za laboratorní teploty. Porovnáním naměřených ploch pro roztoky standardů v obou časových úsecích byla získána informace o jejich stabilitě. Z obr. 7,8 a 9 je zřejmé, že roztoky standardů jsou ve zvoleném časovém úseku stabilní a lze je využít pro změření kalibračních závislostí. Také opakovatelnost dávkování vzorků je vyhovující, opakovatelnost pro deset následných měření se pohybuje od 0,6 do 3,4 %, vyjádřeno jako relativní směrodatná odchylka ploch píků.



Obr. 7 Porovnání ploch píků AMP a ADP o koncentraci 0,6 mg/ml v časovém úseku t = 0 a t = 3 h. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 μl, UV detekce při 260 nm.



Obr. 8 Porovnání ploch píků ATP o koncentraci 0,6 mg/ml v časovém úseku $t = 0$ až $t = 3$ h. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 μl, UV detekce při 260 nm.



Obr. 9 Porovnání ploch píků AMP a ADP o koncentraci 0,006 mg/ml v časovém úseku $t = 0$ až $t = 3$ h. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 μl, UV detekce při 260 nm.

4.2 Kalibrační závislost standardů

K určení obsahu jednotlivých adenosinových ribonukleotidů v listech tabáku byla zvolena metoda kalibrační přímky. Kalibrační závislosti byly měřeny pro roztoky standardů v následujících ředících řadách:

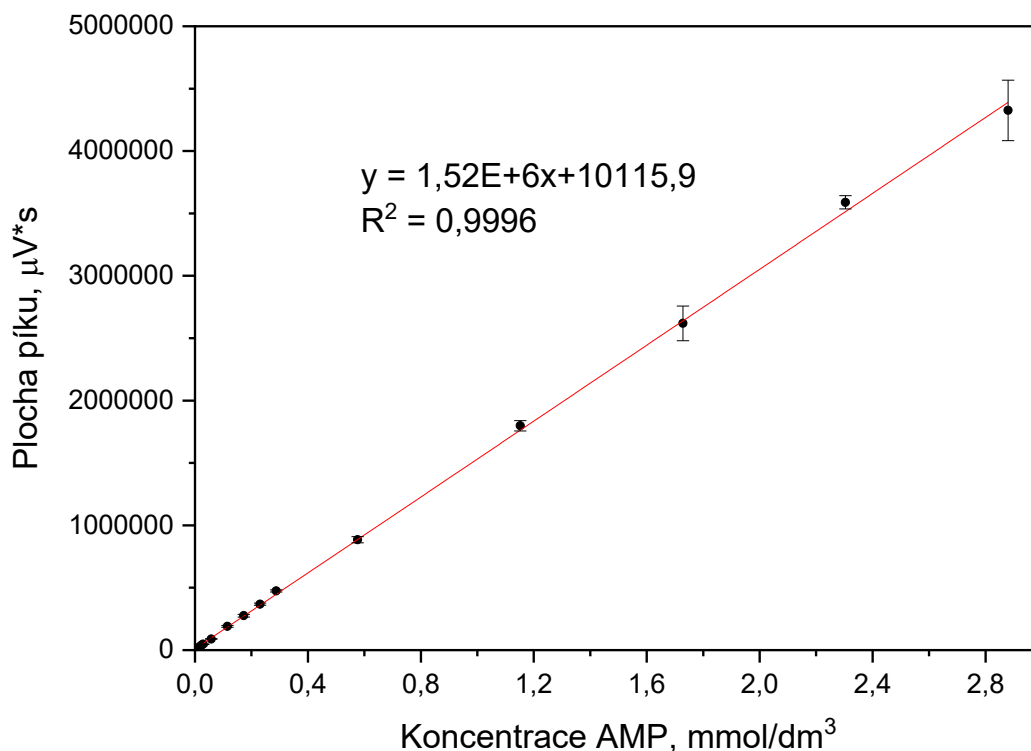
- 1,0 – 0,8 – 0,6 – 0,4 – 0,2 mg/ml
- 0,1 – 0,08 – 0,06 – 0,04 – 0,02 mg/ml
- 0,01 – 0,008 – 0,006 – 0,004 – 0,002 mg/ml
- 0,001 – 0,0008 – 0,0006 – 0,0004 – 0,0002 mg/ml.

Tyto roztoky standardů byly připraveny ředěním ze zásobního roztoku, který byl připraven rozpuštěním navážky 3 mg standardu AMP, ADP nebo ATP ve 3 ml 0,05mol/dm³ KH₂PO₄ o pH = 7,5, čímž vznikl roztok o koncentraci 1 mg/ml. Takto

připravené roztoky byly vloženy do autosampleru v požadovaném pořadí vialek. Analýza probíhala na chromatografické koloně Nucleogel SAX 1000-8 v mobilní fázi tvořené ze 40 objemových % acetonitrilem a z 60 objemových % $0,2\text{mol/dm}^3$ KH_2PO_4 pufrém o $\text{pH} = 5,0$. Teplota kolony byla 30°C , průtok mobilní fáze 1 ml/min a nástřik každého vzorku byl proveden třikrát v objemu $2\text{ }\mu\text{l}$. Detekce probíhala v rozmezí $210 - 290\text{ nm}$, přičemž chromatogramy byly pro vyhodnocení extrahovány při vlnové délce 260 nm .

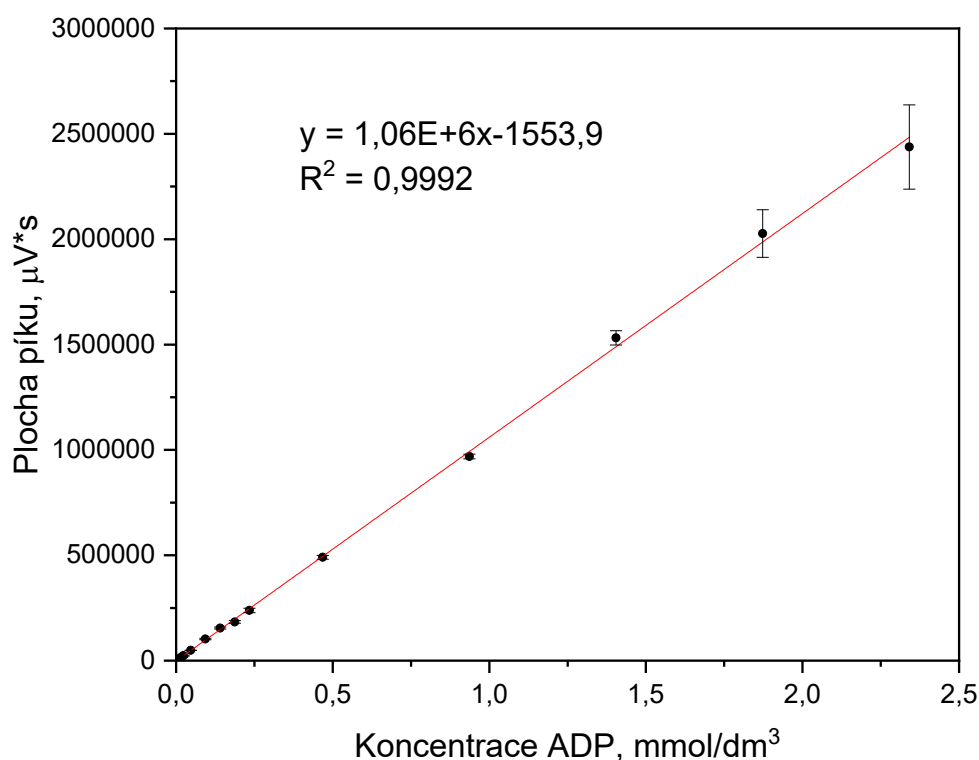
Po naměření ploch píků všech vzorků standardů AMP, ADP a ATP byla určena nejnižší detekovatelná koncentrace standardu, kterou bylo možné odlišit od šumu základní linie, tedy mez detekce LOD. Nejnižší koncentrace, kterou lze s jistotou stanovit, tedy mez stanovitelnosti LOQ, byla dopočtena jako 3,3 násobek hodnoty LOD.

Adenosinmonofosfát eluoval za daných podmínek jako vysoký, ostrý a symetrický pík s retenčním časem $0,914\text{ min}$. Kalibrační závislost byla vynesena pro molární koncentrace AMP v rozmezí $0,002\text{ mmol/dm}^3$ až $2,88\text{ mmol/dm}^3$ ($0,0008\text{ mg/ml}$ až $1,0\text{ mg/ml}$) a je znázorněna na obr. 10. Mez detekce (LOD) AMP byla určena jako koncentrace $8,0 \cdot 10^{-4}\text{ mg/ml}$ ($2,3 \cdot 10^{-6}\text{ mol/dm}^3$). Mez stanovitelnosti LOQ byla spočtena jako koncentrace $2,6 \cdot 10^{-3}\text{ mg/ml}$ ($7,6 \cdot 10^{-6}\text{ mol/dm}^3$)



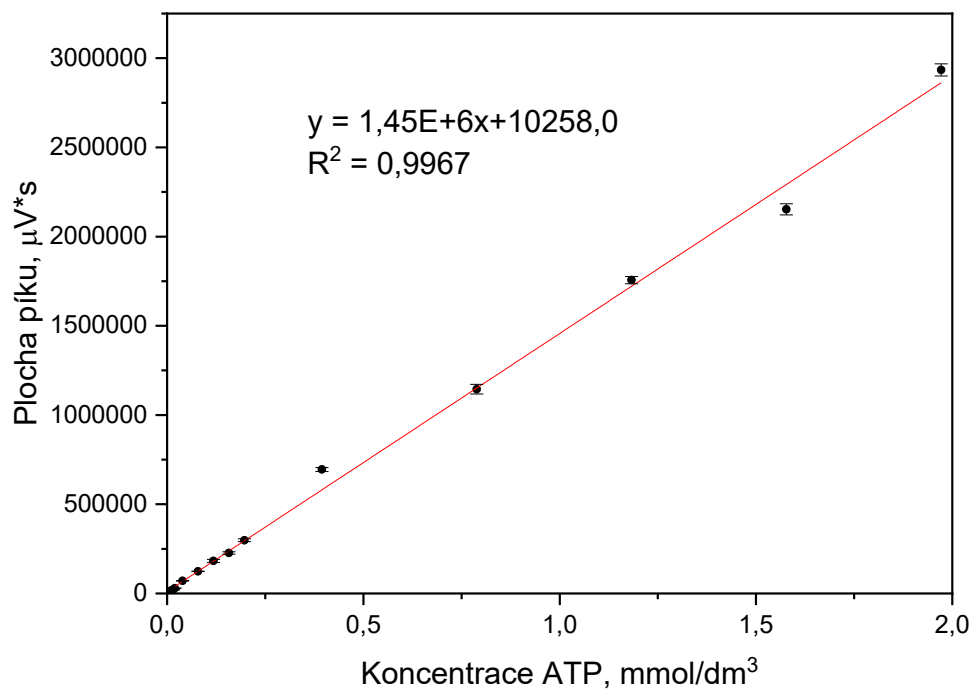
Obr. 10 Závislost plochy píku roztoku standardu AMP na jeho molární koncentraci. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 μl, UV detekce při 260 nm.

Adenosindifosfát poskytoval za daných podmínek nižší pík než AMP, ale stále byl symetrický a ostrý, s retenčním časem 1,434 min. Kalibrační závislost byla sestrojena v rozmezí molárních koncentrací ADP 0,005 mmol/dm³ až 2,34 mmol/dm³ (0,002 mg/ml až 1,0 mg/ml) a je uvedena na obr. 11. Mez detekce (LOD) ADP byla určena jako koncentrace $2,0 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ($4,7 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³). Mez stanovitelnosti LOQ byla spočtena jako koncentrace $6,6 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ($1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³)



Obr. 11 Závislost plochy píku roztoku standardu ADP na jeho molární koncentraci. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 μl, UV detekce při 260 nm.

Adenosintrifosfát eluoval jako nejmenší a nejvíce rozmytý pík s retenčním časem 3,202 min. Rozmytý pík ATP je způsoben tím, že je díky svému náboji zadržován na koloně nejdéle. Kalibrační závislost byla sestrojena v rozmezí molárních koncentrací ATP 0,002 mmol/dm³ až 1,97 mmol/dm³ (0,0008 mg/ml až 1,0 mg/ml). Mez detekce (LOD) ATP byla určena jako koncentrace 8,0*10⁻⁴ mg/ml (1,6*10⁻⁶ mol/dm³). Mez stanovitelnosti LOQ byla spočtena jako koncentrace 2,6*10⁻³ mg/ml (5,2*10⁻⁶ mol/dm³).

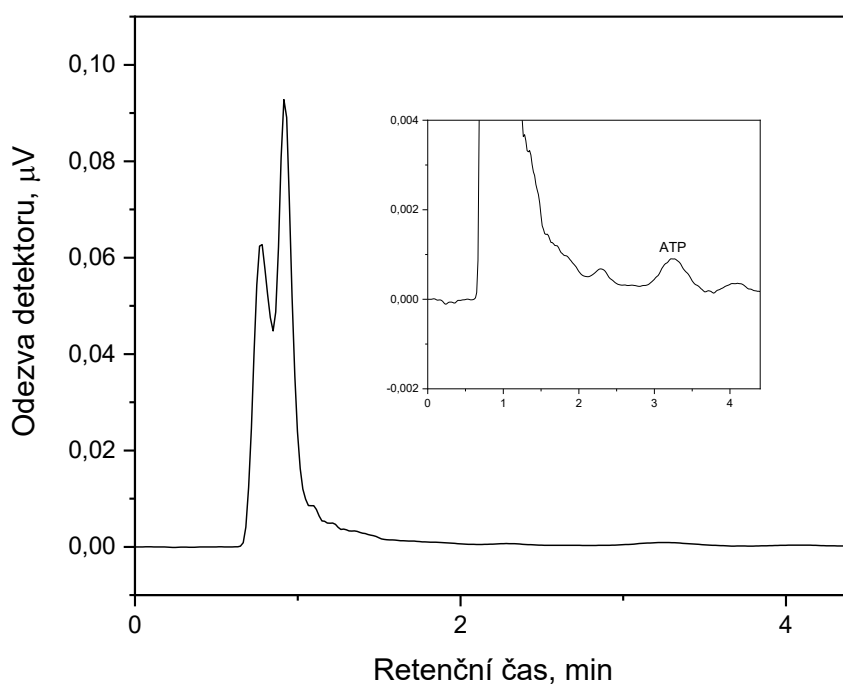


Obr. 12 Závislost plochy píku roztoku standardu ATP na jeho molární koncentraci. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 260 nm.

4.3 Extrakce AMP, ADP a ATP z rostlinného materiálu

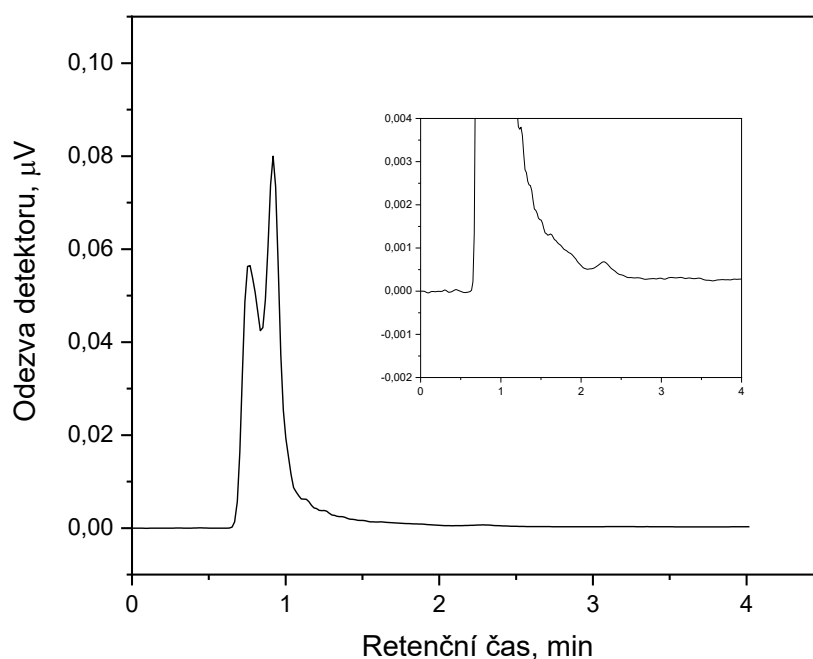
Pro extrakci a stanovení adenosinových ribonukleotidů v autentickém vzorku byly použity lyofilizované listy tabáku viginského, zhomogenizované v třecí misce a navážené v množství 20 mg na analytických vahách. Tento krok byl prováděn za laboratorní teploty a byl použit pro všechny použité postupy extrakce. Celkem bylo provedeno více než 25 extrakcí s různými kombinacemi rozpouštědel a časy jednotlivých extrakčních kroků.

Nejprve byla použita kombinace chlazeného methanolu a chlazené deionizované vody. Oba roztoky byly po dobu 24 hodin ponechány v lednici. K 20 mg zhomogenizovaného vzorku tabáku bylo přidáno 500 μ l methanolu a po dobu 1 min byla směs třepána, aby došlo k rovnoměrné inaktivaci enzymů a sražení proteinů. Poté bylo přidáno 500 μ l deionizované vody a extrakce probíhala 3 min na třepačce v kádince s ledem. Na obr. 13 je patrné, že ve vzorku bylo detekovatelné množství neznámé látky v oblasti retenčního času ATP. Byla porovnána absorpční spektra standardu ATP (λ_{max} 259,7 nm) a píku v extraktu (λ_{max} 260,1 nm) a tento pík byl identifikován jako ATP s odchylkou λ_{max} způsobenou manuální integrací píku. V oblasti retenčního času AMP se ve všech postupech extrakcí objevovaly dva nesymetrické píky. Pravděpodobně by se mohlo jednat o směs organických látek, jako jsou sacharidy nebo fenolové sloučeniny. ADP nebylo pozorováno v detekovatelném množství v žádném z naměřených chromatogramů.



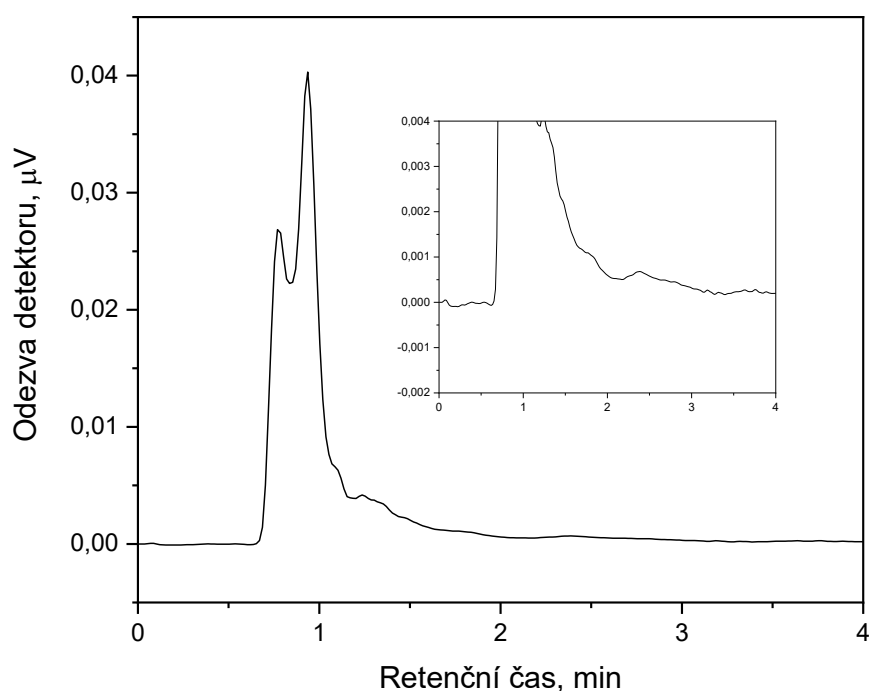
Obr. 13 Chromatogram extraktu s použitím 500 µl chlazeného methanolu a 500 µl deionizované vody s výskytem píku ATP. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 260 nm.

Výše zmíněný extrakční postup byl poté několikrát zopakován, ale pík ATP už nebyl znovu zaznamenán, proto byl jeho ojedinělý výskyt pravděpodobně způsoben kontaminací vzorku při přípravě extrakční směsi. Výsledek jednoho z opakování tohoto extrakčního postupu je zobrazen na obr. 14.



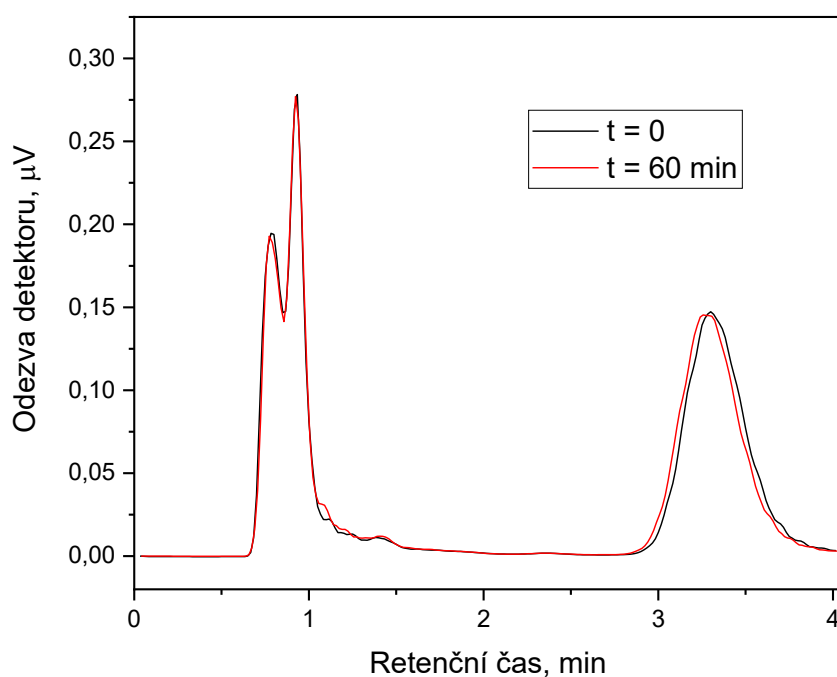
Obr. 14 Chromatogram extraktu s použitím 500 µl chlazeného methanolu a 500 µl deionizované vody bez výskytu píku ATP. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 260 nm.

Extrakce s využitím složek mobilní fáze, tedy 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), poskytovala téměř identické chromatogramy, jako extrakce methanolem a vodou. Proto byla pro extrakci vyzkoušena 1,5mol/dm³ kyselina chloristá. K navážce vzorku byl přidán 1 ml roztoku kyseliny chloristé a směs byla třepána 2 minuty, poté bylo pH upraveno z kyselého na neutrální použitím 5mol/dm³ KOH a pH papírků. Na obr. 15 je patrné, že ani tentokrát nebyl pík ATP v chromatogramu detekován.



Obr. 15 Chromatogram extraktu $1,5\text{mol/dm}^3$ kyselinou chloristou bez výskytu píku ATP. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, $50 \times 4,6$ mm, mobilní fáze tvořená $0,2\text{mol/dm}^3$ KH_2PO_4 , $\text{pH} = 5,0$ a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min , teplota kolony 30°C , nástřik vzorku $2\text{ }\mu\text{l}$, UV detekce při 260 nm .

Pro ověření funkčnosti jediného extrakčního postupu, kde se pík ATP vyskytl, bylo ke zhomogenizovanému vzorku tabáku po inaktivaci methanolem přidáno $500\text{ }\mu\text{l}$ deionizované vody se standardem ATP o koncentraci 1 mg/ml . Extrakt byl změřen a pík ATP byl na chromatogramu přítomen. Inaktivace enzymů byla potvrzena opětovným změřením extraktu po 60 min stání při laboratorní teplotě. Na obr. 16 jsou srovnány chromatogramy extraktů s přidavkem standardu ATP o koncentraci $0,5\text{ mg/ml}$ ($9,9 \cdot 10^{-4}\text{ mol/dm}^3$). Koncentrace standardu ATP, která byla vypočtena na základě kalibrační rovnice (viz obr. 12) z plochy píku, odečtené z chromatogramu extraktu na obr. 16, je $8,9 \cdot 10^{-4}\text{ mol/dm}^3$. Zvoleným extrakčním postupem tedy nedochází k rozkladu ATP a lze ho následně v analyzovaném extraktu detekovat.



Obr. 16 Srovnání chromatogramů extraktů s použitím 500 µl chlazeného methanolu a 500 µl deionizované vody s přidavkem standardu ATP o koncentraci 0,5 mg/ml v čase $t = 0$ a $t = 60$ min. Experimentální podmínky: kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze tvořená 0,2mol/dm³ KH₂PO₄, pH = 5,0 a acetonitrilem (60:40, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min, teplota kolony 30°C, nástřik vzorku 2 µl, UV detekce při 260 nm.

5 Závěr

V této bakalářské práci bylo úspěšně optimalizováno složení mobilní fáze pro stanovení AMP, ADP a ATP ve směsi metodou iontově výměnné HPLC. Byla zvolena isokratická eluce mobilní fází, která obsahovala 60 objemových % 0,2 mol/dm³ dihydrogenfosforečnanového pufru o pH = 5,0 a 40 objemových % acetonitrilu o čistotě gradient grade. Použitím této mobilní fáze se oproti mobilní fázi tvořené samotným pufrům eluce výrazně zrychlila, citlivost detekce se zvýšila a píky byly méně rozmyté. Při měření standardů adenosinových ribonukleotidů byl retenční čas pro AMP 0,914 min, pro ADP 1,434 min a pro ATP 3,202 min.

Dále byly sestrojeny kalibrační závislosti pro vhodná rozpětí koncentrací všech tří ribonukleotidů a byly určeny jejich meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Meze detekce mají hodnotu $2,3 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ pro AMP; $4,7 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ pro ADP a $1,6 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ pro ATP.

Výše zmíněná optimalizovaná separační metoda byla použita pro analýzu autentického vzorku lyofilizovaných listů *Nicotiana tabacum* L. Tento vzorek byl, na základě publikací zpracovaných v teoretické části práce a doporučení vedoucího práce, extrahován v chladu směsí chlazeného methanolu a vody, chlazenou mobilní fází a chlazenou 1,5 mol/dm³ kyselinou chloristou. Extrakce ATP byla úspěšná pouze v jednom z více než 25 pokusů a nepodařilo se ji zopakovat, proto byla přisouzena pravděpodobné kontaminaci vzorku při přípravě extrakční směsi. Po ověření funkčnosti zvolených extrakčních metod ve směsi vzorku tabáku s přídavkem standardu ATP bylo usouzeno, že ATP není ve vzorku přítomno v množství, které by bylo detekovatelné zvolenou metodou analýzy. Důvodem mohl být samotný proces zpracování čerstvě sklizených tabákových listů nebo následné nevhodné skladování rostlinné matrice.

6 Soupis bibliografických citací

- [1] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 978-0815332183.
- [2] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.
- [3] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Color atlas of biochemistry*. 2nd ed., rev. and enl. New York: Thieme, c2005. Thieme flexibook. ISBN 3-13-100372-3.
- [4] VOET, Donald, Judith G. VOET a Charlotte W. PRATT. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 4th ed. Hoboken, NJ: Wiley, c2013. ISBN 978-0470-54784-7.
- [5] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. ISBN 978-80-7080-551-0.
- [6] LEDVINOVÁ, Kateřina. Opakování nukleových kyselin. In: *Moodle 2 - Gymnázium Cheb* [online]. Cheb, 2013 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <http://moodle2.gymcheb.cz/mod/page/view.php?id=3023>
- [7] ŠÍMA, Petr. Význam nukleotidů jako složky výživy pro růst, regeneraci a imunitu. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2008, (12), 555-557 [cit. 2019-04-07]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2008/12/03.pdf>
- [8] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4.
- [9] NELSON, David L., Michael M. COX a Albert L. LEHNINGER. *Lehninger principles of biochemistry*. Seventh edition. Houndmills, Basingstoke: Macmillan Higher Education, [2017]. ISBN 978-1-4641-2611-6.
- [10] SPARKNOTES EDITORS. Cellular Energy Sources. In: *SparkNotes.com* [online]. SparkNotes, 2019 [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: <https://www.sparknotes.com/biology/cellrespiration/intro/section1/>
- [11] MANCUSO, Jordan E., Anjana JAYARAMAN a William D. RISTENPART. Centrifugation-induced release of ATP from red blood cells. *PLoS ONE* [online]. 2018, , 1-13 [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203270>
- [12] PAZDERA, Zdeněk. Rostliny čeledi Solanaceae - lilkovité. *Herbář Wendys* [online]. c2019 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/index.php/component/tags/tag/solanaceae>

- [13] HOSKOVEC, Ladislav. NICOTIANA TABACUM L. – tabák virginský / tabak virginsky. *Botany.cz*[online]. c2007-2019 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/nicotiana-tabacum/>
- [14] PROCHÁZKA, Stanislav. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1998. ISBN 80-200-0586-2.
- [15] PĚKNICOVÁ, Markéta a Dagmar KRUCINOVÁ. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 80-902432-9-0.
- [16] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [17] BARBARO, A. a S. ROŽEK. Studies on luciferin-luciferase ATP assay in plants (etiolated wheat germs, and bean leaves). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* [online]. 1975, **1975**(3), 377-392 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/asbp/article/view/asbp.1975.034>
- [18] CHIDA, Junji, Kazuhiko YAMANE, Tunetomo TAKEI a Hiroshi KIDO. An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Analytica Chimica Acta* [online]. **2012**(727), 8-12 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.022>
- [19] QIN, Xuan a Xin WANG. Quantification of nucleotides and their sugar conjugates in biological samples: Purposes, instruments and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **2018**(158), 280-287 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.013>
- [20] ISHERWOOD, F. A. a F. C. BARRETT. Analysis of phosphate esters in plant material. *Biochem J.* [online]. 1968, **1967**(104), 922–933 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1271234/>
- [21] BERNOCCHI, Palmira, Claudio CECONI, Anna CARGNONI, Paolo PEDERSINI, Salvatore CURELLO a Roberto FERRARI. Extraction and Assay of Creatine Phosphate, Purine, and Pyridine Nucleotides in Cardiac Tissue by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* [online]. 1994, **1994**(222(2)), 374-379 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1505>
- [22] KHLINTSEVA, Svetlana, Andriy B. VISHNIKIN, Ya. R. BAZEL' a V. ANDRUCH. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2009, **7**(64), 657-673 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1134/S1061934809070028. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/225593923_Methods_for_the_determination_of_adenosine_triphosphate_and_other_adenine_nucleotides
- [23] MANZ, A., Petra S. DITTRICH, Nicole PAMME a Dimitri IOSSIFIDIS. *Bioanalytical chemistry*. Second edition. London: Imperial College Press, [2015]. ISBN 978-1-78326-671-5.

- [24] HOU, Faju, Xiaolei WANG a Chongqiu JIANG. Determination of ATP as a Fluorescence Probe with Europium(III)-Doxycycline. *Analytical Sciences* [online]. 2005, **2005**(3), 231-234 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/21/3/21_3_231/_article
- [25] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, c2013. ISBN 978-0-12-385-013-3.
- [26] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985. Knižnice technických aktualit.
- [27] *Teorie HPLC / Základy HPLC* [online]. Česko: Michal Douša, c1999-2016 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [28] GIRI, Dhurba. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications. *LaboratoryInfo* [online]. Nepál, 2019 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
- [29] SOBOTNÍKOVÁ, Jana. *Iontově výměnná chromatografie* [online]. Česká republika, 1996 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/iec.pdf>
- [30] Ion Exchange Chromatography. *Life Science* [online]. USA: Bio-Rad Laboratories, c2019 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/ion-exchange-chromatography?ID=MWHAY9ESH>
- [31] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [32] KONEČNÁ, Markéta. *Extrakce nukleotidů z rostlinné matrice a jejich stanovení iontově výměnnou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií*. Praha, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce RNDr. Jana Sobotníková, Ph. D.